

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

22. 4. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 4月22日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-116916
[ST. 10/C]: [JP2003-116916]

REC'D 01 JUL 2004	
WIPO	PCT

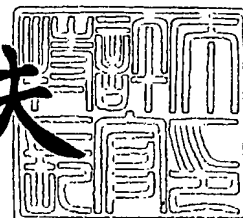
出 願 人
Applicant(s): アークレイ株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 6月 2日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫





【書類名】 特許願

【整理番号】 P-B1012

【提出日】 平成15年 4月22日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07H 21/00
C07H 21/04
C07H 1/06

【発明の名称】 核酸の単離方法およびキット

【請求項の数】 7

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 アークレイ株式
 会社内

 【氏名】 猪瀬 健

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 アークレイ株式
 会社内

 【氏名】 橋口 智史

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 アークレイ株式
 会社内

 【氏名】 和泉澤 裕司

【特許出願人】

 【識別番号】 000141897

 【氏名又は名称】 アークレイ株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100100549

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 川口 嘉之



【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100089244

【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 192372

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要



【書類名】 明細書

【発明の名称】 核酸の単離方法およびキット

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 試料から核酸を単離する方法であって、試料を界面活性剤及び塩を含有する抽出緩衝溶液に懸濁し、該懸濁物を加熱し、加熱した懸濁物をゲル濾過して核酸を含む画分を取得することを特徴とする方法。

【請求項 2】 前記界面活性剤がトライトン X-100（登録商標）である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 前記塩が NaCl である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】 前記試料が真核細胞を含む試料である、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】 前記試料が血液である、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】 試料から核酸を単離するためのキットであって、前記キットは抽出緩衝溶液およびゲル濾過カラムを含み、前記抽出緩衝溶液は少なくとも一種類の界面活性剤および少なくとも一種類の塩を含むことを特徴とする、キット。

【請求項 7】 前記抽出緩衝溶液がトライトン X-100（登録商標）及び NaCl を含む抽出緩衝溶液である、請求項 6 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】


【発明の属する技術分野】

本発明は、試料から核酸を単離する方法、および核酸を単離するためのキットに関する。本発明の方法により単離した核酸は、PCR 法に用いる鋳型として特に好適に用いられる。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

種々のタイプの試料中に存在する生物学的分析対象物を正確に検出することは、臨床的、実験的および疫学的分析などの多くの目的において有用である。すべ



ての生物の遺伝情報は大部分が二本鎖のデオキシリボ核酸 (DNA)、またはリボ核酸 (RNA) のいずれかの核酸において伝えられることから、特定の核酸配列を検出および識別することにより、試験試料内に特定の分析対象物が存在するか否かを決定できる。

【0003】


核酸またはその混合物の一つまたは複数の標的配列を増幅 (amplifying) させることができるポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法の開発により、特定の配列の核酸を検出または識別することが容易になった (例えば、特許文献1参照。)。PCR法では、増幅を行う標的核酸配列に対し、その一部と実質的に相補的であるように選択した二種のプライマーを用いる。これらのプライマーは熱安定性酵素により伸長されて、プライマー伸長生成物を生成し、これを一本鎖に分離すると、さらに標的核酸配列を増幅するための鋳型鎖を生じる。この鋳型鎖に、プライマーが結合し、熱安定性酵素による伸長により、標的核酸配列と同じ配列が合成され、さらに鋳型として働く。PCR法は、温度サイクルにより増幅処理が行われ、プライマーと鋳型のハイブリダイゼーション、合成酵素によるプライマー伸長生成物の合成が、温度の変化に応じて繰り返される。各サイクルは、指数的に標的核酸配列の合成量を増加する。

【0004】

PCR増幅は、感染性疾患、病理学的染色体異常、並びに病理学的状態に結びつかないこともあるDNA多型現象の検知、又は診断を含む数多くの臨床的適用において有用である。PCR増幅は、標的核酸が試料中の他の核酸に比べて相対的に少量しか存在しない場合、核酸含有試料が少量しか得られない場合、又は迅速な検出が望ましい場合に有用である。有用な診断用途として具体的には、鎌状赤血球貧血、 α -サラセミア、 β -サラセミアおよび脾嚢胞性線維症などの遺伝疾患の診断が挙げられる。

【0005】

このようにPCR法は有用な方法として使用されているが、PCR法を行うためには、分析対象の核酸混合物を試料から抽出し、鋳型として使用できるレベルまで精製する必要があった。核酸を試料から抽出、精製する方法としては、これ



までに、試料を緩衝液に溶解し、フェノール／クロロホルムでタンパク質を除去した後、核酸をエタノール等のアルコールで沈殿させる方法（例えば、非特許文献1参照）や、カオトロップ物質を含む緩衝液に試料を溶解した後に、遠心分離して得た上清をシリカゲル等に吸着させ、洗浄後、溶出させる方法（例えば、特許文献2または3参照）等が用いられていた。しかし前者の方法は、フェノール等の有機溶媒を用いなければならず取り扱いに注意が必要であり、後者の方法も洗浄操作を繰り返すため、洗浄液の混入や収率が低いという問題点があった。さらに、いずれの方法を用いても、遠心操作を繰り返すなど、操作が多く、核酸の単離に時間がかかるという問題点があった。

【0006】

一方で、試料を独特の組成の緩衝液と混合し、混合液を遠心分離し、得られた上清を加熱し、加熱処理液を遠心分離して蛋白質を沈殿させ、得られた上清をイソプロパノール沈殿することにより核酸を沈殿させる方法が知られていた（例えば、特許文献4参照。）。しかし、この方法も、溶解後、加熱後、およびイソプロパノール添加後に、遠心操作を行う必要があるため長時間を要し、さらにイソプロパノール沈殿では不純物を除ききれず、PCR増幅用の核酸を得る方法としては必ずしも適当ではなかった。

【0007】

また、ゲル濾過法を用いて核酸を精製することは従来から行われてきたが、ゲル濾過法はもっぱらPCR反応終了後のPCR増幅産物の精製に用いられており、生体試料から核酸を単離する過程で用いられることはなかった。

【0008】**【特許文献1】**

米国特許第4,965,188号

【特許文献2】

欧州特許第389,063号

【特許文献3】

特開2000-342259号公報

【特許文献4】



特開平 9-313181 号公報

【非特許文献 1】

「モレキュラークローニング 実験室マニュアル 第 2 版」 1989 年、第 3 巻、頁 E3-E4

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、試料から簡便、迅速かつ高収率で、核酸を単離する方法を提供すること、及びかかる方法に用いることのできる核酸単離用キットを提供することである。

【0010】

【課題を解決するための手段】

上述の目的を達成するために本発明者らは鋭意研究を行った結果、生体試料を抽出緩衝液に懸濁した後、懸濁液を加熱し、加熱した懸濁液をゲル濾過することで、PCR 阻害物質が除去された DNA が迅速に、高収率で得られることを見出し、本発明を完成させた。

【0011】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1) 試料から核酸を単離する方法であって、試料を界面活性剤及び塩を含有する抽出緩衝溶液に懸濁し、該懸濁物を加熱し、加熱した懸濁物をゲル濾過して核酸を含む画分を取得することを特徴とする方法。

(2) 前記界面活性剤がトライトン X-100 (Triton X-100: 登録商標) である、(1) の方法。

(3) 前記塩が NaCl である、(1) または (2) の方法。

(4) 前記試料が真核細胞を含む試料である、(1) ~ (3) のいずれかの方法。

(5) 前記試料が血液である、(1) ~ (4) のいずれかの方法。

(6) 試料から核酸を単離するためのキットであって、前記キットは抽出緩衝溶液およびゲル濾過カラムを含み、前記抽出緩衝溶液は少なくとも一種類の界面活性剤および少なくとも一種類の塩を含むことを特徴とするキット。

(7) 前記抽出緩衝溶液がトライトン X-100 (Triton X-100:登録商標) およびNaClを含む抽出緩衝溶液である、(6) のキット。

【0012】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0013】

<1>本発明の単離方法


本発明は、試料から核酸を単離する方法であって、試料を界面活性剤及び塩を含有する抽出緩衝溶液に懸濁し、該懸濁物を加熱し、加熱した懸濁物をゲル濾過することを特徴とする方法を提供する。ここで、試料とは遺伝子解析(例えば、PCR解析)を行うための、様々な細胞含有試料をいうが、真核細胞を含む試料が好ましく、具体的には血液、便試料、口腔・鼻腔洗浄液、土壌、食品、培養細胞、微生物懸濁液などが挙げられる。この中でも特に、血液が好ましい。

【0014】

本発明の抽出緩衝液は、一種類以上の界面活性剤と、一種類以上の塩を含有する緩衝液である。緩衝液としては特に限定されず、例えばリン酸緩衝液やTris-EDTA緩衝液が挙げられるが、核酸の保護の観点からはTris-EDTA緩衝液が好ましい。Tris-EDTA緩衝液として具体的には、一般的に用いられる10mM Tris-1mM EDTA溶液等が挙げられるが、これらに限定されない。界面活性剤は特に限定されないが、細胞溶解の点からポリエチレングリコール-モノ-*p*-イソオクチルフェニルエーテルが好ましく、特にトライトン X-100 (商標名) が好ましい。その濃度は0.1%~5%が好ましく、特に0.3%~1%が好ましい。抽出緩衝液中の塩は特に限定されないがDNA結合蛋白質の結合を緩める点から一価の陽イオンの塩が好ましく、NaClがより好ましい。また、その濃度は0.1M~5Mが好ましく、特に0.5M~2Mが好ましい。

【0015】

本発明においてはまず、試料を上記抽出緩衝液に、緩衝液に対して1/3~1/100の容量で懸濁する。懸濁はボルテックスミキサーIMS-1000 (東京理化)等を用いて行うこともできるし、手で行ってもよい。懸濁時間は操作迅速化のた



め、5秒以下が好ましく、3秒以下がより好ましいが、試料の性質によってはこれ以上の時間行ってもよい。この懸濁操作は、試料に含まれる細胞膜を溶解させ細胞内より核酸を抽出すると共に、核酸に結合した種々のDNA結合蛋白質の結合を緩めるものである。

【0016】


次いで、得られた懸濁液を加熱する。本操作は細胞由来の蛋白質、特にDNA結合蛋白質を変性させる。加熱は公知の方法や装置、たとえば湯浴やドライブロックバス(井内盛栄堂社製)等を用いて行うことができる。加熱温度は蛋白質が十分変性しうる温度ならば特に限定はされないが、好ましくは80℃～100℃、より好ましくは90℃～100℃、特に好ましくは95℃～100℃である。また、加熱時間は加熱状態において蛋白質が十分変性しうる時間ならば特に限定はされないが、好ましくは3分～15分、より好ましくは4分～10分、特に好ましくは5分～10分である。

【0017】

次に、加熱した懸濁物をゲル濾過することにより、核酸を含む画分を取得する。加熱した懸濁物はそのままゲル濾過してもよいが、遠心分離した後にゲル濾過してもよい。試料中あるいは細胞内に存在するPCR阻害物質は核酸と比べて低分子であると考えられ、また多くの蛋白質は加熱過程により凝集し不溶化している為、ゲル濾過により試料中からPCR阻害物質を含まない核酸を効率よく精製する事ができるのである。なお、加熱サンプルは室温近くまで放冷してからゲル濾過してもよいが、放冷せずにゲルろ過する方が好ましい。ゲル濾過に用いる担体はSephacryl S-400HR, Sephacryl S-500HR(いずれもアマシャムバイオサイエンス社)、CHROMA SPIN-1000(クロンテック社)、CENTRISPIN-40(PRINCETON SEPARATIONS社)などが好ましい。ゲル濾過操作は、例えば、ゲル濾過担体を含んだ遠心操作が可能なチューブに加熱後の試料を加え、低速(例えば500G以下)で短時間(例えば60秒以下)遠心することによって行うことができる。この遠心操作は室温で行ってもよいし、冷却条件下で行ってもよい。

【0018】

本発明の方法により単離された核酸は、例えば、特異的プライマーを用いたP



PCR反応に用いることができ、例えばインシュリン依存性糖尿病や特定の癌などの病態と関連する遺伝子を検出することができる。また、その他感染症起炎菌、食中毒菌等の病原菌に特異的なプライマーを用いてPCRを行うことにより、それぞれの菌種、菌属に特異的な検出や同定を簡易に行うことができる。本発明の方法により得られた核酸は、また、DNAチップによるハイブリダイゼーションや、クローンライブラリー作成にも用いることができる。

【0019】

<2>本発明のキット

本発明はまた、核酸を単離するためのキットを提供する。本発明のキットは、少なくとも一種類の界面活性剤と少なくとも一種類の塩を含有する緩衝液、およびゲル濾過カラムを含むキットである。キットに含有される緩衝液は、試料を溶解させるためのもので、具体的には上述したような界面活性剤（例えば、トライトン X-100）と塩（例えば、NaCl）を含む緩衝液をいう。キットに含まれるゲル濾過カラムとしては、例えば、上述のゲル濾過担体を充填した遠心可能なスピンのカラムが挙げられる。

【0020】

【実施例】

以下、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0021】

1. DNAの単離

以下に示す各種の方法により、健康成人10名の血液試料(抗凝固剤(ヘパリンリチウム)を含む)からそれぞれDNAを単離し、得られたDNAを用いてPCR法を行って、DNAの存在量の確認、PCR阻害物質の除去能を比較した。

【0022】

2. PCR反応

調製されたDNA溶液の10倍希釈系列(×10、×100、×1000)を作成し、これを鋳型に用い、プライマーに β -globin (human) Primer Set (タカラバイオ株式会社)を用いてPCR反応を行うことにより、 β -globinを増幅した。反応液の

組成は、10 mM Tris-HCl (pH8.3)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、200 μ M dNTP mixture、各0.5 μ Mの β -globin遺伝子（配列番号1：増幅サイズ262 bp）特異的プライマー（KM29（配列番号2）及びKM38（配列番号3））、0.625 U Taq DNA Polymerase（タカラバイオ株式会社）とし、鋳型DNAを1 μ lまたは12.5 μ l加えて、総容量をH₂Oで25 μ lとした。PCRのプログラムは94℃で1分加熱した後、94℃で1分、55℃で2分、72℃で1分を30サイクルで行い、最後に72℃で5分間反応した。増幅産物は6 μ lを3% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色することにより解析した。

【0023】

比較例1（プロテアーゼを含む緩衝液とシリカゲルカラムを用いる方法によるDNAの単離）

QIAamp DNA Mini Kit（QIAGEN社）を用いて血液試料からDNAを単離した。まず、血液試料200 μ lをキットに付属のQIAGEN Protease 20 μ lおよびBuffer AL 200 μ lと混合し、15秒ボルテックスした後、56℃で10分間インキュベートした。次にスピンドウンしてから100%エタノール200 μ lを添加し、15秒間ボルテックスした後、スピンドウンした。この混合液を付属のシリカゲルスピнкаラムに移し、6000 gで1分遠心してDNAをカラムに吸着させた。付属のBuffer AW1を500 μ l添加して6000 gで1分遠心して洗浄し、さらに付属のBuffer AW2を500 μ l添加し、20000 gで3分遠心して洗浄した。続いてスピнкаラムを新しいチューブに移し、付属のBuffer AEを200 μ l添加して室温で1分放置した後、6000 gで1分遠心してDNA抽出液を溶出した。単離に要した時間は25分であった。

【0024】

比較例2（カオトロップ物質を含む緩衝液とシリカゲルカラムを用いる方法によるDNAの単離）

GFX Genome Blood DNA Purification Kit (Amersham Biosciences社)を用いて血液試料からDNAを単離した。血液試料100 μ lとキットに付属のextraction solution（カオトロピックイオンを含有）500 μ lとを混合し、ボルテック

スして室温で5分間放置した。この混合液を付属のGFXカラムに移し、5000gで1分間遠心してDNAを吸着させた。さらに、付属のextraction solutionを500 μ l添加して5000gで1分間遠心して洗浄した。続いて、付属のwash solutionを500 μ l添加して20000gで1分間遠心して洗浄した。カラムを新しいチューブへ移し、予め70℃に暖めたキット付属のelution buffer 100 μ lを添加し、室温で1分間放置した後、5000gで1分間遠心し、DNA抽出液を得た。単離に要した時間は20分であった。

【0025】

実施例1 (本発明の方法によるDNAの単離)

血液20 μ lに抽出緩衝溶液(10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA, 0.5% トライトン X-100, 2M NaCl) 180 μ lを加えて3秒間懸濁し、98℃で5分加熱した。加熱の間にゲル濾過スピнкаラムを作製した。ゲル濾過スピнкаラムはゲル濾過担体: CHROMA SPIN-1000(CLONTECH社) 600 μ lをスピнкаラム: MicroSpin Empty Column(Amersham Biosciences社)に充填し、700gで2分間遠心して内部の液を出すことにより作製した。加熱終了後、サンプルをただちにボルテックスミキサーで懸濁し、500Gで10秒間遠心した後、上清100 μ lを先に作製したゲル濾過スピнкаラムに供した。スピнкаラムを300gで1分間遠心し、DNA抽出液を溶出した。単離に要した時間は10分であった。

【0026】

3. 結果

3-1. QIAamp DNA Mini Kitにより単離したDNAを用いたPCR

10試料からそれぞれQIAamp DNA Mini Kitを用いて上記比較例1のようにDNAを抽出し、PCR反応を行ってDNAの有無を調べたところ、9試料については100分の1希釈のサンプルまで増幅産物が得られたが検体番号1からは増幅産物が得られなかった(図1)。また、抽出試料を反応系に12.5 μ l添加しPCR増幅を試みたところ、検体番号5からは増幅産物が得られず、残りの9試料については増幅産物が得られたものの、全体的に増幅産物量が少なかった(図2)。このことから阻害物質が混入している事が示唆された。

【0027】

3-2. GFX Genome Blood DNA Purification Kitにより単離したDNAを用いたPCR

10試料からそれぞれGFX Genome Blood DNA Purification Kitを用いて上記比較例2のようにDNAを抽出し、PCR法によりDNAの有無を調べたところ、6試料については100分の1希釈のサンプルまで増幅産物が得られたが検体番号5、6、8、9からは増幅産物が得られなかった(図3)。一方、抽出試料を反応系に12.5 μ l添加しPCR増幅を試みたところ、全ての試料で増幅産物が得られ、阻害物質が除去されていることがわかった(図4)。

【0028】

3-3. 本発明の方法により単離したDNAを用いたPCR

10試料からそれぞれ本発明の単離法によりDNAを抽出し、PCR法によりDNAの有無を調べたところ、全ての試料で100分の1希釈のサンプルまで増幅産物が得られた(図5)。また、抽出試料を反応系に12.5 μ l添加しPCR増幅を試みたところ、全ての試料で増幅産物が得られ、阻害物質が効率よく除去されていることがわかった(図6)。

【0029】

以上のように、本発明の単離法を用いた場合(血液20 μ lを用いた)は、出発試料が他の2法(比較例1:200 μ l、比較例2:100 μ l)に比べ少ないにもかかわらず、PCRにおいて同等以上の増幅DNA量が得られたことから、迅速に高収率でDNAを抽出できることがわかり、かつPCR阻害物質も効率よく除去できたと考えられた。

【0030】

【発明の効果】

本発明の方法により、PCR阻害物質など多くの夾雑物を含む試料から従来法と同程度、またはそれ以上の回収率で、より迅速、簡便にPCR反応に適した核酸を単離することができる。本発明の方法により単離された核酸を用いると、従来よりも迅速にPCR法等を用いた遺伝子解析をすることが可能である。

【0031】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> ARKRAY, Inc.

<120> Methods for isolating nucleic acids from biological materials

<130> P-B1012

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 262

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ggttggccaa tctactccca ggagcaggga gggcaggagc cagggctggg cataaaagtc 60

agggcagagc catctattgc ttacatttgc ttctgacaca actgtgttca ctagcaacct 120

caaacagaca ccatgggtgca cctgactcct gaggagaagt ctgccgttac tgccctgtgg 180

ggcaaggtga acgtggatga agttgggtgg gaggccctgg gcaggttggt atcaaggtta 240

caagacaggt ttaaggagac ca 262

<210> 2



<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 2

ggttggccaa tctactccca gg

22

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 3

tggtctcctt aaacctgtct tg

22

【図面の簡単な説明】

【図 1】 QIAamp DNA Mini Kitを用いて単離したDNA溶液を10倍希釈系列で希釈したものを、鋳型に用いてPCRを行った結果を示す図（写真）。Mは分子量マーカー(100bp ladder)、各ウェルの番号は検体番号である。

【図 2】 QIAamp DNA Mini Kitを用いて単離したDNA溶液を反応系に半量(12.5 μ l)添加し、PCRを行った結果を示す図（写真）。Mは分子量マーカー(100bp ladder)、各ウェルの番号は検体番号である。

【図 3】 GFX Genome Blood DNA Purification Kitを用いて単離したDN



A溶液を10倍希釈系列で希釈したものを、鋳型に用いてPCRを行った結果を示す図(写真)。Mは分子量マーカー(100bp ladder)、各ウェルの番号は検体番号である。

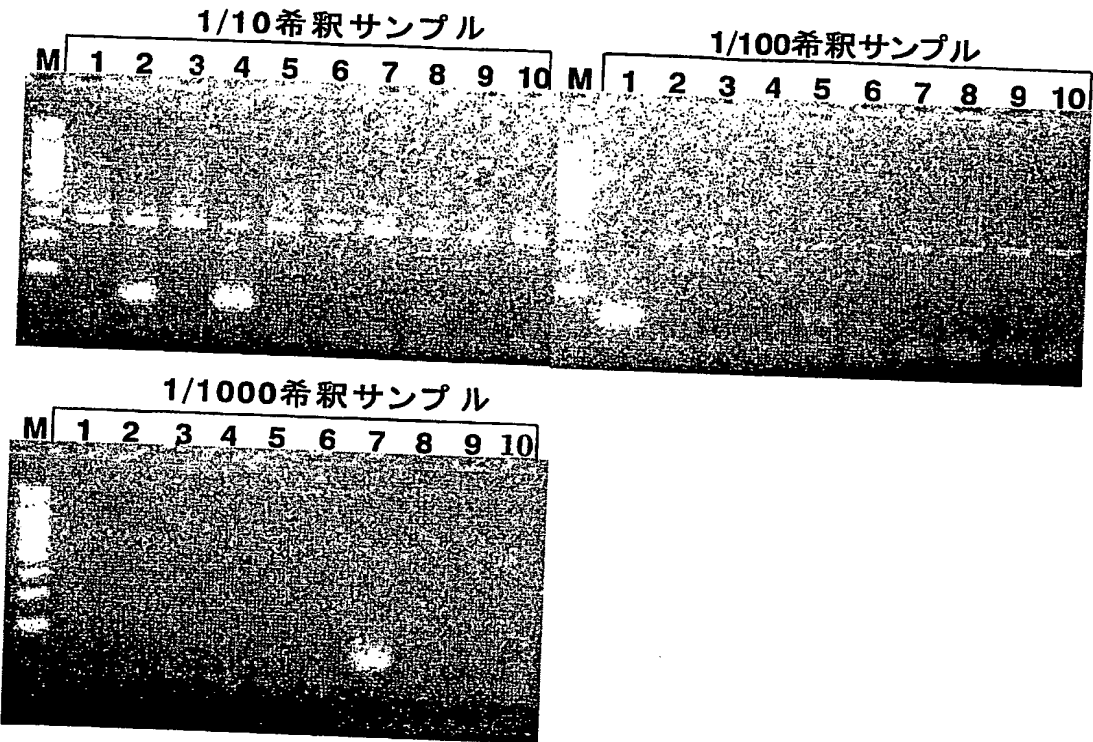
【図4】 GFX Genome Blood DNA Purification Kitを用いて単離したDNA溶液を反応系に半量添加し、PCRを行った結果を示す図(写真)。Mは分子量マーカー(100bp ladder)、各ウェルの番号は検体番号である。

【図5】 本発明の単離方法により単離したDNA溶液を10倍希釈系列で希釈したものを、鋳型に用いてPCRを行った結果を示す図(写真)。Mは分子量マーカー(100bp ladder)、各ウェルの番号は検体番号である。

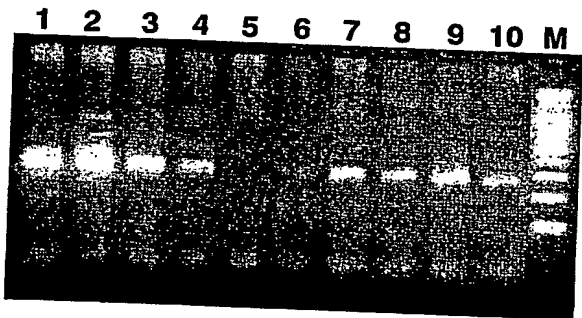
【図6】 本発明の単離方法により単離したDNA溶液を反応系に半量添加し、PCRを行った結果を示す図(写真)。Mは分子量マーカー(100bp ladder)、各ウェルの番号は検体番号である。

【書類名】 図面

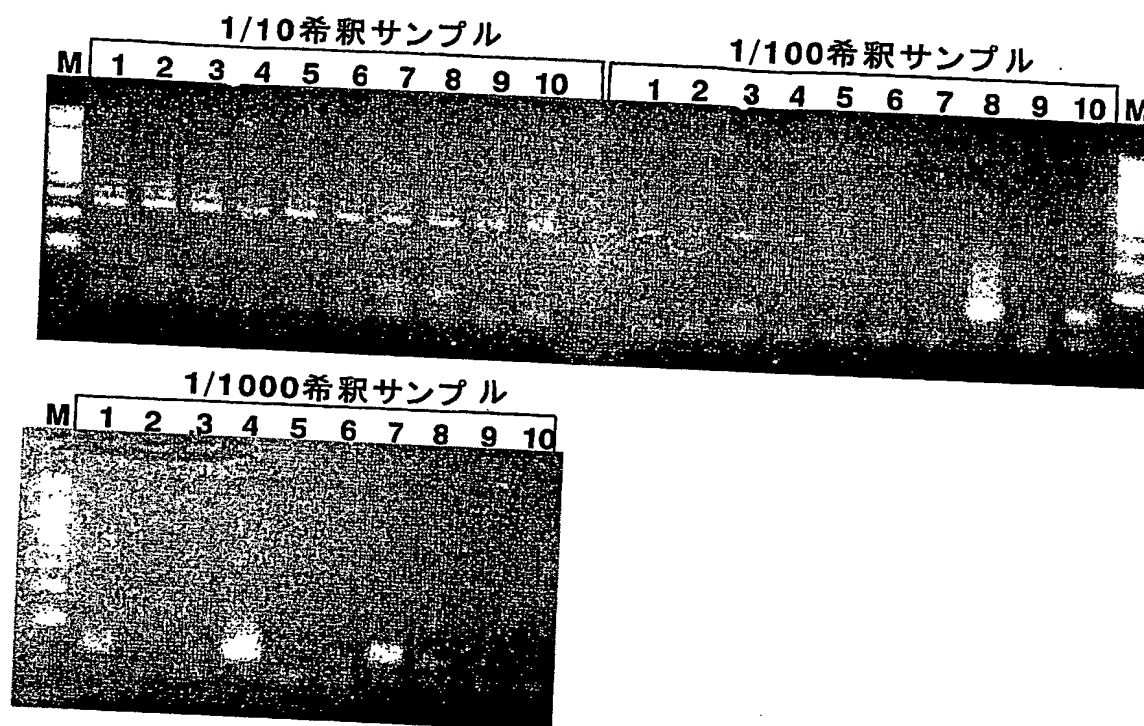
【図 1】



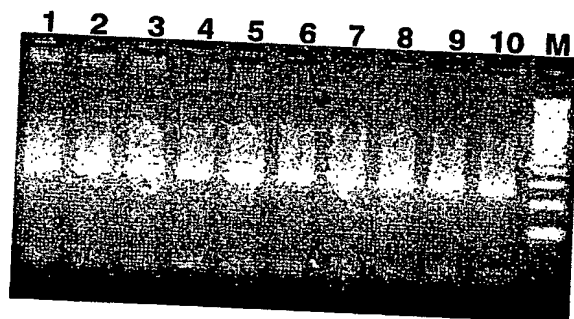
【図 2】



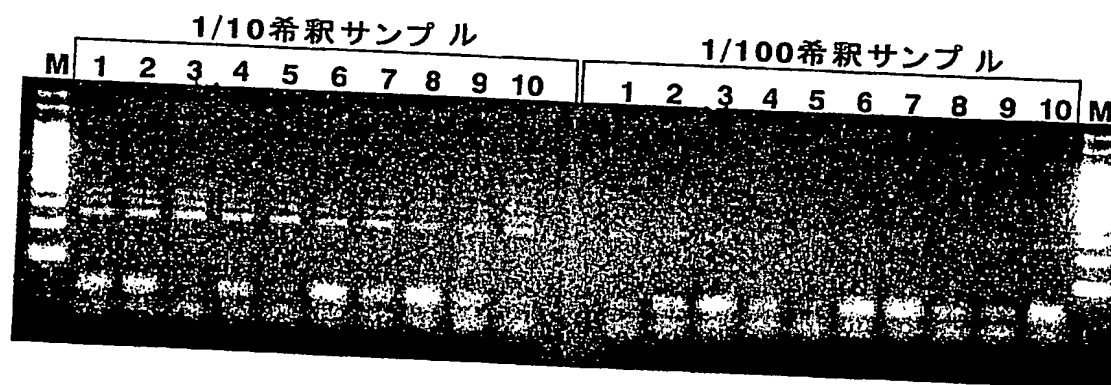
【図3】



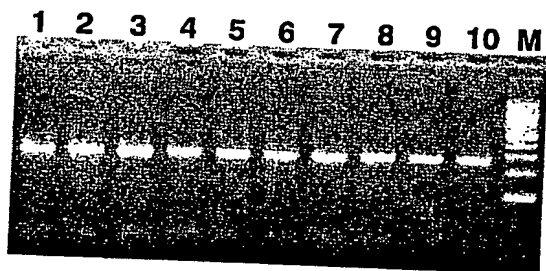
【図4】



【図5】



【図6】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 試料から核酸を、簡便、迅速、かつ高収率で、PCR増幅処理に適するように単離することのできる方法およびキットを提供する。

【解決手段】 試料を界面活性剤及び塩を含有する抽出緩衝溶液に懸濁し、該懸濁物を加熱し、加熱した懸濁物をゲル濾過して核酸を含む画分を取得する。

【選択図】 図5



特願 2003-116916

ページ: 1/E

出願人履歴情報

識別番号

[000141897]

1. 変更年月日
[変更理由]
住所
氏名

2000年 6月12日
名称変更
京都府京都市南区東九条西明田町57番地
アークレイ株式会社